

## Best Available Copy

**Novel microparticles containing active compound, media containing these, their use for the ultrasonically controlled release of active compounds and process for the production thereof**

**Patent number:** DE4330958  
**Publication date:** 1995-03-16  
**Inventor:** WEITSCHIES WERNER DR. (DE); FITZSCH THOMAS DR. (DE); STAHL HARALD DR. (DE)  
**Applicant:** SCHERING AG (DE)  
**Classification:**  
- **International:** A61K9/00; A61K9/16; A61K41/00; A61K49/22; A61K9/00; A61K9/16; A61K41/00; A61K49/22; (IPC1-7): B01J13/12; A61K9/52  
- **European:** A61K9/00L8; A61K9/16H6B; A61K9/16H6D4; A61K41/00M; A61K49/22P4  
**Application number:** DE19934330958 19930909  
**Priority number(s):** DE19934330958 19930909

[Report a data error here](#)

**Abstract of DE4330958**

The invention relates to novel microparticles containing active compound, which, additionally to the active compound(s), contain at least one gas or gaseous phase, media (microparticulate systems) containing these particles, their use for the ultrasonically controlled in vivo release of active compound and process for the production of the particles and media.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 43 30 958 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**B01J 13/12**  
A 61 K 9/52

②① Aktenzeichen: P 43 30 958.5  
②② Anmeldetag: 9. 9. 93  
②③ Offenlegungstag: 16. 3. 95

DE 43 30 958 A 1

⑦① Anmelder:  
Schering AG, 13353 Berlin, DE

⑦② Erfinder:  
Weitschies, Werner, Dr., 10961 Berlin, DE; Fitzsch,  
Thomas, Dr., 12169 Berlin, DE; Stahl, Harald, Dr.,  
12205 Berlin, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, diese enthaltende Mittel, deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten Freisetzung von Wirkstoffen sowie Verfahren zu deren Herstellung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas oder eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten in vivo Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

DE 43 30 958 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 95 408 081/290

8/33

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas bzw. eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten in vivo Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

Mikropartikuläre Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreigabe gibt es schon seit vielen Jahren. Eine Vielzahl an möglichen Hüllsubstanzen und Wirkstoffen läßt sich hierzu verwenden. Ebenso gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Herstellungsverfahren. Zusammenstellungen über die verwendeten Hüllsubstanzen und Herstellungsverfahren finden sich z. B. bei: M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert: Mikro- und Nanopartikeln als Arzneistoffträgersysteme unter besonderer Berücksichtigung der Herstellungsmethoden, Pharmazie 44 (1989) 585—593 und M. Chasin, R. Langer (eds.): Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, 1990.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus mikropartikulären Systemen beruht überwiegend auf Diffusions- oder Erosionsprozessen [vgl. C. Washington: Drug release from microdisperse systems: A critical review, Int. J. Pharm. 58 (1990) 1—12 und J. Heller: Bioerodible Systems, in: R.S. Langer, D.L. Wice (eds.): Medical applications of controlled release Vol. 1, CRC Press, Florida, 1984, p. 69—101].

Diese Prinzipien sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß die zeitliche Steuerbarkeit der Wirkstofffreisetzung aus mikrodispersen Systemen in vivo auf die Geschwindigkeit des Erosionsprozesses und/oder Diffusionsprozesses begrenzt ist und nach Applikation nicht weiter beeinflußt werden kann.

Die bislang bekannten Konzepte zur örtlichen Steuerung der Wirkstofffreisetzung in vivo aus mikropartikulären Systemen beruhen fast ausschließlich entweder auf unspezifischen Anreicherungen der mikropartikulären Wirkstoffträger in bestimmten Zielorganen wie Leber und Milz oder auf Maßnahmen zur gezielten Veränderung der Organverteilung in vivo nach Applikation durch die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der mikropartikulären Systeme mit Hilfe von Tensiden oder spezifitätsvermittelnden Stoffen wie z. B. Antikörpern [vgl. R.H. Müller: Colloidal carriers for controlled drug delivery — Modification, characterization and in vivo distribution —, Kiel, 1989; S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter: Modification of the biodistribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, Int. J. Pharm. 61 (1991), 85—100; S.S. Davis, L. Illum, J.G. Mcvie, E. Tomlinson (eds.): Microspheres and drug therapy, Elsevier science publishers B.V., 1984 und H. Tsuji, S. Osaka, H. Kiwada: Targeting of liposomes surfacemodified with glycyrrhizin to the liver, Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 1004—1008]. Alle diese Verfahren bieten darüber hinaus jedoch keine weitere Möglichkeit den Ort der Wirkstofffreisetzung nach Applikation aktiv zu beeinflussen. Des weiteren ist es nicht möglich, das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe nach Applikation zu beeinflussen.

Erste Versuche, aktiv den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, beruhen auf der Möglichkeit, vorhandene, bzw. induzierte pH- oder Temperaturdifferenzen zur Freisetzung zu benutzen [vgl. H. Hazemoto, M. Harada, N. Kamatsubara, M. Haga, Y. Kato: PH-sensitive liposomes composed of phosphatidyl-ethanolamine and fatty acid, Chem. Pharm. Bull. 58 (1990) 748—751 und J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Gatwin, D.S. Zaharko: Liposomes and local hyperthermia, Science 204 (1979) 188—191]. Diese Methoden sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß sie entweder begrenzt sind auf Fälle wo die erforderlichen Temperatur- bzw. pH-Differenzen bereits vorliegen (z. B. im Tumorgewebe) oder die entsprechenden zur Freisetzung erforderlichen Parameter nur durch aufwendige, z. T. invasive Maßnahmen herbeigeführt werden müssen. Darüber hinaus ist im letzteren Fall die örtliche Auflösung gering.

Ein weiteres bekanntes Verfahren besteht in der Verwendung von Mikropartikeln, die durch in den Partikeln verkapselte Ferrofluide über äußerlich angelegte Magnetfelder innerhalb bestimmter Körpersegmente anreicherbar sind [K.J. Widder, A.E. Senyei: Magnetic microspheres: A vehicle for selective targeting of drugs, Pharmac. Ther. 20 (1983) 377—395]. Die Verwendung derartiger Mikropartikel erfordert allerdings die gleichzeitige gezielte Anwendung starker, fokussierbarer Magnetfelder. Magnete, die derartige Felder erzeugen, sind jedoch in der Medizin wenig verbreitet. Desweiteren läßt sich die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe auf diese Weise nicht beeinflussen.

In der U.S. Patentschrift 4,657,543 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem die Freisetzung durch Ultraschall-einwirkung auf wirkstoffhaltige Polymerblöcke hervorgerufen wird. Dieser Effekt beruht im wesentlichen auf einer verstärkten Erosion des Polymers unter Schalleinwirkung. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß es nur für ortsfeste Implantate geeignet ist. Für deutliche Effekte ist zudem die Verwendung sehr hoher Schalldrücke oder von Dauerschallsignalen notwendig, die zur Gewebeschädigung führen können.

In der WO 92/22298 werden Liposomen beschrieben, die sich durch Einstrahlung von Ultraschall, der im Bereich der Resonanzfrequenz der Mikrobälchen liegt, zerstören lassen. Dabei tritt der verkapselte Wirkstoff aus. Die Resonanzfrequenz wird mit ca. 7,5 MHz angegeben. Diagnostischer Ultraschall derart hoher Frequenz weist jedoch aufgrund der hohen Absorption durch Körpergewebe nur eine geringe Eindringtiefe (wenige Zentimeter) auf. Die beschriebenen Liposomen sind deshalb nur für die Freisetzung von Wirkstoffen in oberflächennahen Gebieten des Körpers geeignet.

Es besteht daher für vielfältige Zwecke weiterhin ein Bedarf gezielt applizierbaren Formulierungen, die die genannten Nachteile des Standes der Technik überwinden, d. h. bei denen sowohl der Ort und Zeitpunkt der Wirkstofffreisetzung als auch die Menge der abgegebenen Substanz, gezielt durch einfache, nicht invasive Maßnahmen gesteuert werden kann. Die Formulierungen sollten darüber hinaus eine hohe Stabilität, insbesondere in Hinblick auf mechanische Einflüsse, aufweisen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde derartige Formulierungen zur Verfügung zu stellen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen.

Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß bei mikropartikulären Systemen, die zusammengesetzt sind aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln, die aus einer bioabbaubaren Hülle und einem gas- und wirkstoffhaltigen Kern bestehen, überraschenderweise bei der Bestrahlung mit diagnostischen Ultraschallwellen in einem Frequenzbereich der unterhalb der Resonanzfrequenz der Partikel liegt, die Hülle die-

ser Partikel zerstört wird und so der (die) verkapselte(n) Wirkstoff(e) gezielt freigesetzt wird (werden).

Die Erfindung betrifft somit neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die neben dem Wirkstoff ein Gas, eine gasförmige Phase oder Gasgemische enthalten, sowie mikropartikuläre Systeme bestehend aus den erfindungsgemäßen Mikropartikeln sowie einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium.

Die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme sind aufgrund ihrer Eigenschaften für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen unter Einwirkung von diagnostischen Ultraschall geeignet.

Die Partikel weisen eine Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$ , bevorzugt kleiner als  $0,6 \text{ g/cm}^3$  auf und haben eine Größe im Bereich von  $0,1 - 8 \mu\text{m}$ , vorzugsweise  $0,3 - 7 \mu\text{m}$ . Aufgrund der geringen Größe verteilen sie sich nach i.v. Injektion innerhalb des gesamten Gefäßsystems. Unter Sichtkontrolle auf dem Monitor eines diagnostischen Ultraschallgerätes kann dann durch Intensivierung des Schallsignals eine vom Anwender gesteuerte Freisetzung der enthaltenen Stoffe herbeigeführt werden, wobei die zur Freisetzung erforderliche Frequenz unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikropartikel liegt. Geeignete Frequenzen liegen im Bereich von  $1 - 6 \text{ MHz}$ , bevorzugt zwischen  $1,5 - 5 \text{ MHz}$ .

Dadurch ist erstmalig innerhalb des gesamten Körpers eine kombinierte Steuerung der Wirkstofffreigabeorte und des Wirkstofffreigabeortes durch den Anwender möglich. Diese Freisetzung, durch Zerstörung der Partikelhülle, ist überraschenderweise auch mit Ultraschallfrequenzen weit unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikropartikel in der medizinischen Diagnostik üblichen Schalldrücken möglich, ohne daß es zu einer Erwärmung des Gewebes kommt. Dieses ist besonders deswegen bemerkenswert, weil auf Grund der großen mechanischen Stabilität der Partikelhülle — wie sie z. B. in Hinblick auf Lagerstabilität von Vorteil ist — eine Zerstörung der Hülle mit relativ energiearmer Strahlung nicht zu erwarten war.

Die Wirkstofffreigabe kann aufgrund des hohen Gasanteils der Partikel und der damit verbundenen Echogenität, in vivo über die Abnahme des empfangenen Ultraschallsignals kontrolliert werden.

Es wurde weiterhin gefunden, daß die aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen freigesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu dem reinen Wirkstoff überraschenderweise eine erhöhte pharmakologische Wirksamkeit zeigen.

Als Hüllmaterialien für die Gas/Wirkstoff enthaltenden Mikropartikel eignen sich prinzipiell alle biologisch abbaubaren und physiologisch verträglichen Materialien, wie z. B. Proteine wie Albumin, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate wie z. B. succinylierte Gelatine, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol (z. B. mit Polyethylenglykol konjugiertes Albumin), Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, biologisch abbaubare synthetische Polymere wie Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton und deren Gemische. Besonders geeignet sind Albumin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polycarbonate, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton.

Das (die) eingeschlossene(n) Gas(e) können beliebig

gewählt werden, wobei jedoch physiologisch unbedenkliche Gase wie Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase oder deren Gemische bevorzugt sind. Ebenfalls geeignet sind Ammoniak, Kohlendioxid sowie dampfförmige Flüssigkeiten, wie z. B. Wasserdampf.

Der pharmazeutische Wirkstoff kann ebenfalls beliebig gewählt werden. Als Beispiele seien genannt Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile bakteriologischer Zellwände, Nukleinsäuren (DNA, RNA), Peptide wie z. B. Endothelin, Proteine, Glycoproteine, Hormone, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, tromboolytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Zytokine (wie z. B. Interleukine, koloniestimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF, G-CSF) und/oder Prostaglandine. Bevorzugt werden jedoch Wirkstoffe verwendet, deren applizierte Dosis (bei bolusförmiger Injektion)  $100 \text{ mg}$  pro Anwendung nicht übersteigt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen, wie zuvor beschrieben, eine Erhöhung der pharmakologischen Wirksamkeit erreicht wird, wobei in verschiedenen Fällen eine Wirkungsverstärkung beobachtet werden kann, wodurch die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme auch für Wirkstoffe einsetzbar sind, die auf konventionellem Wege im Bolus höher als  $100 \text{ mg}$  pro Anwendung dosiert werden müssen.

Sind noch höhere Dosierungen erforderlich, so empfiehlt es sich die Mittel über einen längeren Zeitraum als Infusionslösung zu verabreichen.

Obleich es über die genannten Limitierungen hinaus keine weiteren Einschränkungen gibt, können die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme besonders dort mit Vorteil eingesetzt werden, wo es auf Grund einer geringen in vivo Lebensdauer des Wirkstoffs in freier Form nicht möglich ist, das Zielorgan zu erreichen, ohne daß zuvor Zersetzung des Wirkstoffs eingetreten ist. Zu derartigen Wirkstoffen zählen verschiedene Hormone, Peptide und Proteine.

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel besteht darin, daß zunächst in an sich bekannter Weise (DE 38 03 972, WO 93/00933, EP 0 514 790, WO 92/17213, US 5,147,631, WO 91/12823, EP 0 048 745) gasgefüllte Mikropartikel hergestellt werden. Erfindungsgemäß werden diese dann mit in überkritischen Gasen gelösten Wirkstoffen befüllt. Dazu werden die mit geeigneten Verfahren getrockneten (z. B. Gefriertrocknung) gashaltigen Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas in einem Autoklaven behandelt. Zweckmäßigerweise verfährt man, indem Wirkstoff und gasgefüllter Mikropartikel gemeinsam in einem Autoklaven vorgelegt werden und dieser anschließend mit dem überkritischen Gas oder Gasgemisch befüllt wird. Als überkritische Gase eignen sich je nach Wirkstoff alle Gase, die in einen überkritischen Zustand überführt werden können, insbesondere jedoch überkritisches Kohlendioxid, überkritischer Stickstoff, überkritischer Ammoniak sowie überkritische Edelgase. Nach der Behandlung der Mikropartikel mit der Lösung des Wirkstoffs im überkritischen Gas oder Gasgemisch wird der überschüssige Wirkstoff an der äußeren Oberfläche der Mikropartikel falls erforderlich durch Waschen der Mikropartikel in einem geeigneten Medium entfernt und die so gereinigten Partikel gewünschtenfalls gefriergetrocknet. Dieses Verfahren ist für alle Wirkstoffe geeignet, die sich in überkritischen Gasen oder Gasgemischen lösen, wie z. B. Peptide oder lipophile Arzneistoffe.

fe.

Ein alternatives Verfahren, das sich insbesondere zur Verkapselung von Wirkstoffen die in überkritischen Gasen oder Gasgemischen unlöslich sind (wie z. B. Proteine, zuckerhaltige Verbindungen), eignet, beruht auf der Verkapselung einer wirkstoffhaltigen wäßrigen Phase mittels einer Mehrfachemulsion. Als besonders geeignet haben sich Wasser/Öl/Wasser (W/O/W)-Emulsionen erwiesen. Dazu wird das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01–20% (m/V) gelöst. In diese Lösung wird eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert, daß eine Emulsion vom Typ W/O entsteht. Beide Lösungen können zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten. Bevorzugt ist es jedoch, aus Gründen der im allgemeinen begrenzten biologischen Verträglichkeit von Emulgatoren, auf diese weitgehend zu verzichten. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, der inneren wäßrigen Phase pharmazeutisch akzeptable Quasiemulgatoren wie z. B. Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Albumin oder Dextrane im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25% zuzusetzen. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, in der inneren wäßrigen Phase, gegebenenfalls zusätzlich zu den anderen verwendeten Hilfsstoffen, 0,1–20% (m/V) eines gut wasserlöslichen pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Zuckers oder Zuckeralkohols, wie z. B. Natriumchlorid, Galaktose, Mannitol, Laktose, Saccharose, Glukose, Natriumhydrogenphosphat zu lösen. Es kann außerdem vorteilhaft sein, die innere wäßrige Phase vor der Emulgierung mit der verwendeten organischen Phase zu sättigen. Die hergestellte Emulsion vom Typ W/O sollte eine mittlere Tröpfchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm aufweisen. Diese Emulsion wird unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gegeben. Das organische Lösungsmittel wird unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt. Die erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel werden erforderlichenfalls gewaschen und anschließend getrocknet, daß die innere Wasserphase ohne Zerstörung der Mikropartikel entfernt wird. Grundsätzlich geeignete Trocknungsverfahren sind die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung. Bevorzugt ist die Gefriertrocknung. Dazu wird in der Suspension der Mikropartikel ein gerüstbildender Hilfsstoff wie z. B. Zucker, Zuckeralkohole, Gelatine, Gelatine-Derivate, Albumin, Aminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol in einer Konzentration von ca. 0,5–20% (m/V) gelöst. Die Suspension wird anschließend bei möglichst tiefen Temperaturen, bevorzugt unterhalb ca. –30°C eingefroren und dann gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung und Redispersierung in einem geeigneten Suspensionsmedium, lassen sich die entstandenen gashaltigen Mikropartikel der erforderlichen Dichte durch Flotation oder Zentrifugation, von eventuell ebenfalls vorhandenen soliden oder immer noch wassergefüllten Mikropartikeln abtrennen und falls erforderlich, möglichst unter Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriergetrocknen. Die Mikropartikel enthalten dann den verkapselten Wirkstoff und Gas bzw. gasförmige Phase nebeneinander.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme aus den nach den vorbeschriebenen Verfahren hergestellten Partikel erfolgt durch Resuspendieren der Partikel in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium. Das Resuspendieren in

einem geeigneten Medium kann sich unmittelbar an den letzten Verfahrensschritt (die Gefriertrocknung) anschließen, kann aber gewünschtenfalls auch erst durch den behandelnden Arzt vor der Anwendung erfolgen.

In letzterem Fall liegen die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme als ein Kit, bestehend aus einem ersten die Partikel enthaltenden Behälter und einem zweiten das Suspensionsmedium enthaltenden Behälter, vor. Die Größe des ersten Behälters ist so zu wählen, daß auch das Suspensionsmedium in diesem vollständig Platz findet. So kann z. B. mittels einer Spritze über eine im Verschuß des ersten Behälters befindliche Membran, das Suspensionsmedium vollständig zu den Partikeln gegeben werden und durch anschließendes Schütteln die injektionsfertige Suspension hergestellt werden.

Als Suspensionsmedien kommen alle dem Fachmann bekannten injizierbaren Medien in Frage, wie z. B. physiologische Kochsalzlösung, Wasser p.i. oder 5%ige Glukoselösung.

Die applizierte Menge richtet sich nach dem jeweilig eingeschlossenen Wirkstoff. Als orientierender oberer Grenzwert kann ein Wert angenommen werden, wie er auch bei konventioneller Verabreichung des jeweiligen Wirkstoffs verwendet werden würde. Auf Grund des wirkungsverstärkenden Effekts sowie der Möglichkeit den Wirkstoff spezifisch aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären System freizusetzen, liegt die erforderliche Dosis im allgemeinen jedoch unter diesem oberen Grenzwert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

#### Beispiel 1

##### Coffein-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylat

Gasgefüllte Mikropartikel, die aus Butylcyanacrylsäure gemäß DE 38 03 972 hergestellt wurden, werden unter Zusatz von 2% (m/V) Polyvinylalkohol gefriergetrocknet. Es werden ca.  $3 \cdot 10^9$  Partikel in Form des Lyophilisats zusammen mit 50 mg Coffein in einen Autoklaven gefüllt. Das Gemisch wird bei ca. 45°C und 100–120 bar mit Kohlendioxid behandelt. Die Entfernung des überschüssigen Coffeins wird folgendermaßen durchgeführt: Die dem Autoklaven entnommenen Mikropartikel werden in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Partikel werden durch Zentrifugation abgetrennt und in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Zentrifugation mit anschließender Redispersierung in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, wird solange wiederholt, bis im Wasser kein Coffein mehr photometrisch bei 273 nm nachgewiesen werden kann.

#### Beispiel 2

##### Fibrinolytische Mikropartikel aus Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

2 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 10 mg r t-PA (Gewebplasminogenaktivator) werden in 4 ml einer 4%igen wäßrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emul-



gierung werden 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78°C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf.

### Beispiel 3

#### in vitro Freisetzung von Coffein durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 1 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von 10<sup>8</sup> Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer mittleren Schalleistung (Transmit ≤ 20 dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf Coffein bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit > 30 dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun nachweisbares freies Coffein, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte.

### Beispiel 4

#### in vitro Freisetzung von r t-PA durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 2 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von 10<sup>8</sup> Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer geringen Schalleistung (Transmit ~ 10 dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf r t-PA bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit > 30 dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun nachweisbares freies r t-PA, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte. Die mit dem erhöhten Schalldruck behandelte Partikelsuspension weist fibrinolytische Eigenschaften auf.

### Beispiel 5

#### Mitomycin-haltige Mikropartikel aus Polymilchsäure

2 g Polymilchsäure (MG ca. 20 000) werden in 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 20 mg Mitomycin werden in 15 ml 0,9%iger wässriger Kochsalzlösung gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 1%igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG ca. 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden

durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5%igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (MG ca. 10 000) in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich auch als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Mitomycin frei.

### Beispiel 6

#### Vincristinsulfat-haltige Mikropartikel aus Poly-ε-caprolacton

2 g Poly-ε-caprolacton (MG ca. 40 000) werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 10 mg Vincristinsulfat werden in 15 ml einer 5%igen wässrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 5%igen Lösung von Humanalbumin in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5%igen Lösung von Humanalbumin in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Vincristinsulfat frei.

### Beispiel 7

#### Ilomedin-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylsäurebutylester

3 g Polycyanacrylsäurebutylester werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 1 mg Ilomedin wird in 15 ml einer 5%igen wässrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 2,5%igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 10%igen Lösung von Lactose in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Ilomedin frei.

### Beispiel 8

#### Methylenblau-haltige Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

4 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 20 mg Methylenblau werden in 4 ml einer 4%igen wäßrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnelllaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei  $-78^\circ\text{C}$  eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als  $0,7 \text{ g/cm}^3$  auf und setzen bei Beschallung mit Ultraschall (Schalldruck  $> 50 \text{ dB}$ , Frequenz 2,5 MHz) Methylenblau frei.

#### Patentansprüche

1. Wirkstoffhaltige Mikropartikel, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel neben dem Wirkstoff auch eine gasförmige Phase enthalten.
2. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichte der Partikel kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$  ist.
3. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße  $0,1 - 8 \text{ µm}$  ist.
4. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelhülle aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymeren aufgebaut ist.
5. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch abbaubares Polymer Proteine, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol, Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly-ε-caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und ε-Caprolacton oder deren Gemische verwendet wird.
6. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile bakteriologischer Zellwände, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombozytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, Glykoproteine, Hormone, Zytokine und/oder Prostaglandine enthalten ist.
7. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß als gasförmige Phase Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Edelgase, Ammoniak und/oder Wasserdampf enthalten ist.
8. Mikropartikuläre Systeme bestehend aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln nach Anspruch 1-7.
9. Mikropartikuläre Systeme nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenen Partikel durch Einstrahlung von diagnostischem

Ultraschall unter Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs zerstört werden können.

10. Verfahren zur gezielten in vivo Wirkstofffreisetzung aus mikropartikulären Systemen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenen Partikel nach der Applikation mit diagnostischem Ultraschall bestrahlt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz des diagnostischen Ultraschalls  $1 - 6$  bevorzugt  $1,5 - 5 \text{ MHz}$  beträgt.

12. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß gashaltige Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas, bevorzugt in überkritischem Kohlendioxid, überkritischem Stickstoff, überkritischem Ammoniak sowie überkritischen Edelgasen, in einem Autoklaven behandelt, anschließend gewünschtenfalls gewaschen und gefriergetrocknet werden.

13. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von  $0,01 - 20\%$  (m/V) gelöst wird und in diese Lösung eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert wird, daß eine Wasser in Öl Emulsion mit einer mittleren Teilchengröße der inneren Phase von ca.  $0,1$  bis  $10 \text{ µm}$  entsteht, wobei beide Lösungen gegebenenfalls zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten können und man anschließend diese Emulsion unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gibt, das organische Lösungsmittel unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt, die so erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel falls gewünscht zunächst wäscht und anschließend, falls gewünscht unter Zugabe von Gerüstbildenden Hilfsstoffen gefrier- bzw. sprühtrocknet und falls gewünscht in einem geeigneten Suspensionsmedium redispersiert und die Mikropartikel mit einer Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$  durch Flotation oder Zentrifugation abtrennt und falls erforderlich gewünschtenfalls unter erneutem Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriergetrocknet.

14. Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Systemen, dadurch gekennzeichnet, daß Mikropartikel nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium suspendiert werden.

15. Ein Kit bestehend aus einem ersten Behälter enthaltend die wirkstoff- und gashaltigen Mikropartikel nach Anspruch 1 und einem zweiten Behälter enthaltend eine pharmazeutisch verträgliche Trägerflüssigkeit, die nach Mischen mit dem Inhalt des ersten Behälters eine fließfähige injizierbare Suspension ergibt, wobei a) das Volumen des ersten Behälters so gewählt ist, daß zusätzlich zu den Partikeln auch die Trägerflüssigkeit vollständig Platz darin findet und b) beide Behälter jeweils eine Dosisinheitsmenge an wirkstoffhaltigen Mikropartikeln bzw. Trägerflüssigkeit enthalten.

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 43 30 958 A 1

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
B 01 J 13/12  
A 61 K 9/52

⑳ Aktenzeichen: P 43 30 958.5  
㉔ Anmeldetag: 9. 9. 93  
㉕ Offenlegungstag: 16. 3. 95

DE 43 30 958 A 1

㉚ Anmelder:  
Schering AG, 13353 Berlin, DE

㉚ Erfinder:  
Weitschies, Werner, Dr., 10961 Berlin, DE; Fitzsch,  
Thomas, Dr., 12169 Berlin, DE; Stahl, Harald, Dr.,  
12205 Berlin, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉜ Neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, diese enthaltende Mittel, deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten Freisetzung von Wirkstoffen sowie Verfahren zu deren Herstellung

㉞ Die Erfindung betrifft neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas oder eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten in vivo Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

DE 43 30 958 A 1



Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas bzw. eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten in vivo Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

Mikropartikuläre Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreigabe gibt es schon seit vielen Jahren. Eine Vielzahl an möglichen Hüllsubstanzen und Wirkstoffen läßt sich hierzu verwenden. Ebenso gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Herstellungsverfahren. Zusammenstellungen über die verwendeten Hüllsubstanzen und Herstellungsverfahren finden sich z. B. bei: M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert: Mikro- und Nanopartikeln als Arzneistoffträgersysteme unter besonderer Berücksichtigung der Herstellungsmethoden, Pharmazie 44 (1989) 585—593 und M. Chasin, R. Langer (eds.): Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, 1990.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus mikropartikulären Systemen beruht überwiegend auf Diffusions- oder Erosionsprozessen [vgl. C. Washington: Drug release from microdisperse systems: A critical review, Int. J. Pharm. 58 (1990) 1—12 und J. Heller: Bioerodible Systems, in: R.S. Langer, D.L. Wice (eds.): Medical applications of controlled release Vol. 1, CRC Press, Florida, 1984, p. 69—101].

Diese Prinzipien sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß die zeitliche Steuerbarkeit der Wirkstofffreisetzung aus mikrodispersen Systemen in vivo auf die Geschwindigkeit des Erosionsprozesses und/oder Diffusionsprozesses begrenzt ist und nach Applikation nicht weiter beeinflusst werden kann.

Die bislang bekannten Konzepte zur örtlichen Steuerung der Wirkstofffreisetzung in vivo aus mikropartikulären Systemen beruhen fast ausschließlich entweder auf unspezifischen Anreicherungen der mikropartikulären Wirkstoffträger in bestimmten Zielorganen wie Leber und Milz oder auf Maßnahmen zur gezielten Veränderung der Organverteilung in vivo nach Applikation durch die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der mikropartikulären Systeme mit Hilfe von Tensiden oder spezifitätsvermittelnden Stoffen wie z. B. Antikörpern [vgl. R.H. Müller: Colloidal carriers for controlled drug delivery — Modification, characterization and in vivo distribution —, Kiel, 1989; S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter: Modification of the biodistribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, Int. J. Pharm. 61 (1991), 85—100; S.S. Davis, L. Illum, J.G. Mcvie, E. Tomlinson (eds.): Microspheres and drug therapy, Elsevier science publishers B.V., 1984 und H. Tsuji, S. Osaka, H. Kiwada: Targeting of liposomes surfacemodified with glycyrrhizin to the liver, Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 1004—1008]. Alle diese Verfahren bieten darüber hinaus jedoch keine weitere Möglichkeit den Ort der Wirkstofffreisetzung nach Applikation aktiv zu beeinflussen. Des weiteren ist es nicht möglich, das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe nach Applikation zu beeinflussen.

Erste Versuche, aktiv den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, beruhen auf der Möglichkeit, vorhandene, bzw. induzierte pH- oder Temperaturdifferenzen zur Freisetzung zu benutzen [vgl. H. Hazemoto, M. Harada, N. Kamatsubara, M. Haga, Y. Kato: PH-sen-

sitive liposomes composed of phosphatidyl-ethanolamine and fatty acid, Chem. Pharm. Bull. 58 (1990) 748—751 und J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Gatwin, D.S. Zaharko: Liposomes and local hyperthermia, Science 204 (1979) 188—191]. Diese Methoden sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß sie entweder begrenzt sind auf Fälle wo die erforderlichen Temperatur- bzw. pH-Differenzen bereits vorliegen (z. B. im Tumorgewebe) oder die entsprechenden zur Freisetzung erforderlichen Parameter nur durch aufwendige, z. T. invasive Maßnahmen herbeigeführt werden müssen. Darüber hinaus ist im letzteren Fall die örtliche Auflösung gering.

Ein weiteres bekanntes Verfahren besteht in der Verwendung von Mikropartikeln, die durch in den Partikeln verkapselte Ferrofluide über äußerlich angelegte Magnetfelder innerhalb bestimmter Körpersegmente anreicherbar sind [K.J. Widder, A.E. Senyei: Magnetic microspheres: A vehicle for selective targeting of drugs, Pharmac. Ther. 20 (1983) 377—395]. Die Verwendung derartiger Mikropartikel erfordert allerdings die gleichzeitige gezielte Anwendung starker, fokussierbarer Magnetfelder. Magnete, die derartige Felder erzeugen, sind jedoch in der Medizin wenig verbreitet. Desweiteren läßt sich die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe auf diese Weise nicht beeinflussen.

In der U.S. Patentschrift 4,657,543 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem die Freisetzung durch Ultraschall-einwirkung auf wirkstoffhaltige Polymerblöcke hervorgerufen wird. Dieser Effekt beruht im wesentlichen auf einer verstärkten Erosion des Polymers unter Schalleinwirkung. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß es nur für ortsfeste Implantate geeignet ist. Für deutliche Effekte ist zudem die Verwendung sehr hoher Schalldrücke oder von Dauerschallsignalen notwendig, die zur Gewebeschädigung führen können.

In der WO 92/22298 werden Liposomen beschrieben, die sich durch Einstrahlung von Ultraschall, der im Bereich der Resonanzfrequenz der Mikrobäschen liegt, zerstören lassen. Dabei tritt der verkapselte Wirkstoff aus. Die Resonanzfrequenz wird mit ca. 7,5 MHz angegeben. Diagnostischer Ultraschall derart hoher Frequenz weist jedoch aufgrund der hohen Absorption durch Körpergewebe nur eine geringe Eindringtiefe (wenige Zentimeter) auf. Die beschriebenen Liposomen sind deshalb nur für die Freisetzung von Wirkstoffen in oberflächennahen Gebieten des Körpers geeignet.

Es besteht daher für vielfältige Zwecke weiterhin ein Bedarf gezielt applizierbaren Formulierungen, die die genannten Nachteile des Standes der Technik überwinden, d. h. bei denen sowohl der Ort und Zeitpunkt der Wirkstofffreisetzung als auch die Menge der abgegebenen Substanz, gezielt durch einfache, nicht invasive Maßnahmen gesteuert werden kann. Die Formulierungen sollten darüber hinaus eine hohe Stabilität, insbesondere in Hinblick auf mechanische Einflüsse, aufweisen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde derartige Formulierungen zur Verfügung zu stellen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen.

Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß bei mikropartikulären Systemen, die zusammengesetzt sind aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln, die aus einer bioabbaubaren Hülle und einem gas- und wirkstoffhaltigen Kern bestehen, überraschenderweise bei der Bestrahlung mit diagnostischen Ultraschallwellen in einem Frequenzbereich der unterhalb der Resonanzfrequenz der Partikel liegt, die Hülle die-

ser Partikel zerstört wird und so der (die) verkapselte(n) Wirkstoff(e) gezielt freigesetzt wird (werden).

Die Erfindung betrifft somit neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die neben dem Wirkstoff ein Gas, eine gasförmige Phase oder Gasgemische enthalten, sowie mikropartikuläre Systeme bestehend aus den erfindungsgemäßen Mikropartikeln sowie einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium.

Die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme sind aufgrund ihrer Eigenschaften für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen unter Einwirkung von diagnostischen Ultraschall geeignet.

Die Partikel weisen eine Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$ , bevorzugt kleiner als  $0,6 \text{ g/cm}^3$  auf und haben eine Größe im Bereich von  $0,1 - 8 \text{ }\mu\text{m}$ , vorzugsweise  $0,3 - 7 \text{ }\mu\text{m}$ . Aufgrund der geringen Größe verteilen sie sich nach i.v. Injektion innerhalb des gesamten Gefäßsystems. Unter Sichtkontrolle auf dem Monitor eines diagnostischen Ultraschallgerätes kann dann durch Intensivierung des Schallsignals eine vom Anwender gesteuerte Freisetzung der enthaltenen Stoffe herbeigeführt werden, wobei die zur Freisetzung erforderliche Frequenz unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikropartikel liegt. Geeignete Frequenzen liegen im Bereich von  $1 - 6 \text{ MHz}$ , bevorzugt zwischen  $1,5 - 5 \text{ MHz}$ .

Dadurch ist erstmalig innerhalb des gesamten Körpers eine kombinierte Steuerung der Wirkstofffreigabe und des Wirkstofffreigabeortes durch den Anwender möglich. Diese Freisetzung, durch Zerstörung der Partikelhülle, ist überraschenderweise auch mit Ultraschallfrequenzen weit unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikrobläschen mit in der medizinischen Diagnostik üblichen Schalldrücken möglich, ohne daß es zu einer Erwärmung des Gewebes kommt. Dieses ist besonders deswegen bemerkenswert, weil auf Grund der großen mechanischen Stabilität der Partikelhülle — wie sie z. B. in Hinblick auf Lagerstabilität von Vorteil ist — eine Zerstörung der Hülle mit relativ energieärmer Strahlung nicht zu erwarten war.

Die Wirkstofffreigabe kann aufgrund des hohen Gasanteils der Partikel und der damit verbundenen Echogenität, in vivo über die Abnahme des empfangenen Ultraschallsignals kontrolliert werden.

Es wurde weiterhin gefunden, daß die aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen freigesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu dem reinen Wirkstoff überraschenderweise eine erhöhte pharmakologische Wirksamkeit zeigen.

Als Hüllmaterialien für die Gas/Wirkstoff enthaltenden Mikropartikel eignen sich prinzipiell alle biologisch abbaubaren und physiologisch verträglichen Materialien, wie z. B. Proteine wie Albumin, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate wie z. B. succinylierte Gelatine, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol (z. B. mit Polyethylenglykol konjugiertes Albumin), Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, biologisch abbaubare synthetische Polymere wie Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton und deren Gemische. Besonders geeignet sind Albumin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polycarbonate, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton.

Das (die) eingeschlossene(n) Gas(e) können beliebig

gewählt werden, wobei jedoch physiologisch unbedenkliche Gase wie Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase oder deren Gemische bevorzugt sind. Ebenfalls geeignet sind Ammoniak, Kohlendioxid sowie dampfförmige Flüssigkeiten, wie z. B. Wasserdampf.

Der pharmazeutische Wirkstoff kann ebenfalls beliebig gewählt werden. Als Beispiele seien genannt Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile bakteriologischer Zellwände, Nukleinsäuren (DNA, RNA), Peptide wie z. B. Endothelin, Proteine, Glycoproteine, Hormone, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombolytische Agentien, tumornekrose Faktoren, Zytokine (wie z. B. Interleukine, koloniestimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF, G-CSF) und/oder Prostaglandine. Bevorzugt werden jedoch Wirkstoffe verwendet, deren applizierte Dosis (bei bolusförmiger Injektion)  $100 \text{ mg}$  pro Anwendung nicht übersteigt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen, wie zuvor beschrieben, eine Erhöhung der pharmakologischen Wirksamkeit erreicht wird, wobei in verschiedenen Fällen eine Wirkungsverstärkung beobachtet werden kann, wodurch die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme auch für Wirkstoffe einsetzbar sind, die auf konventionellem Wege im Bolus höher als  $100 \text{ mg}$  pro Anwendung dosiert werden müssen.

Sind noch höhere Dosierungen erforderlich, so empfiehlt es sich die Mittel über einen längeren Zeitraum als Infusionslösung zu verabreichen.

Obgleich es über die genannten Limitierungen hinaus keine weiteren Einschränkungen gibt, können die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme besonders dort mit Vorteil eingesetzt werden, wo es auf Grund einer geringen in vivo Lebensdauer des Wirkstoffs in freier Form nicht möglich ist, das Zielorgan zu erreichen, ohne daß zuvor Zersetzung des Wirkstoffs eingetreten ist. Zu derartigen Wirkstoffen zählen verschiedene Hormone, Peptide und Proteine.

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel besteht darin, daß zunächst in an sich bekannter Weise (DE 38 03 972, WO 93/00933, EP 0 514 790, WO 92/17213, US 5,147,631, WO 91/12823, EP 0 048 745) gasgefüllte Mikropartikel hergestellt werden. Erfindungsgemäß werden diese dann mit in überkritischen Gasen gelösten Wirkstoffen befüllt. Dazu werden die mit geeigneten Verfahren getrockneten (z. B. Gefriertrocknung) gashaltigen Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas in einem Autoklaven behandelt. Zweckmäßigerweise verfährt man, indem Wirkstoff und gasgefüllter Mikropartikel gemeinsam in einem Autoklaven vorgelegt werden und dieser anschließend mit dem überkritischen Gas oder Gasgemisch befüllt wird. Als überkritische Gase eignen sich je nach Wirkstoff alle Gase, die in einen überkritischen Zustand überführt werden können, insbesondere jedoch überkritisches Kohlendioxid, überkritischer Stickstoff, überkritischer Ammoniak sowie überkritische Edelgase. Nach der Behandlung der Mikropartikel mit der Lösung des Wirkstoffs im überkritischen Gas oder Gasgemisch wird der überschüssige Wirkstoff an der äußeren Oberfläche der Mikropartikel falls erforderlich durch Waschen der Mikropartikel in einem geeigneten Medium entfernt und die so gereinigten Partikel gewünschtenfalls gefriertrocknet. Dieses Verfahren ist für alle Wirkstoffe geeignet, die sich in überkritischen Gasen oder Gasgemischen lösen, wie z. B. Peptide oder lipophile Arzneistoffe.

fe.

Ein alternatives Verfahren, das sich insbesondere zur Verkapselung von Wirkstoffen die in überkritischen Gasen oder Gasgemischen unlöslich sind (wie z. B. Proteine, zuckerhaltige Verbindungen), eignet, beruht auf der Verkapselung einer wirkstoffhaltigen wäßrigen Phase mittels einer Mehrfachemulsion. Als besonders geeignet haben sich Wasser/Öl/Wasser (W/O/W)-Emulsionen erwiesen. Dazu wird das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01–20% (m/V) gelöst. In diese Lösung wird eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert, daß eine Emulsion vom Typ W/O entsteht. Beide Lösungen können zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten. Bevorzugt ist es jedoch, aus Gründen der im allgemeinen begrenzten biologischen Verträglichkeit von Emulgatoren, auf diese weitgehend zu verzichten. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, der inneren wäßrigen Phase pharmazeutisch akzeptable Quasiemulgatoren wie z. B. Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Albumin oder Dextrane im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25% zuzusetzen. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, in der inneren wäßrigen Phase, gegebenenfalls zusätzlich zu den anderen verwendeten Hilfsstoffen, 0,1–20% (m/V) eines gut wasserlöslichen pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Zuckers oder Zuckeralkohols, wie z. B. Natriumchlorid, Galaktose, Mannitol, Laktose, Saccharose, Glukose, Natriumhydrogenphosphat zu lösen. Es kann außerdem vorteilhaft sein, die innere wäßrige Phase vor der Emulgierung mit der verwendeten organischen Phase zu sättigen. Die hergestellte Emulsion vom Typ W/O sollte eine mittlere Tröpfchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm aufweisen. Diese Emulsion wird unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gegeben. Das organische Lösungsmittel wird unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt. Die erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel werden erforderlichenfalls gewaschen und anschließend so getrocknet, daß die innere Wasserphase ohne Zerstörung der Mikropartikel entfernt wird. Grundsätzlich geeignete Trocknungsverfahren sind die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung. Bevorzugt ist die Gefriertrocknung. Dazu wird in der Suspension der Mikropartikel ein gerüstbildender Hilfsstoff wie z. B. Zucker, Zuckeralkohole, Gelatine, Gelatine-Derivate, Albumin, Aminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol in einer Konzentration von ca. 0,5–20% (m/V) gelöst. Die Suspension wird anschließend bei möglichst tiefen Temperaturen, bevorzugt unterhalb ca. –30°C eingefroren und dann gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung und Redispergierung in einem geeigneten Suspensionsmedium, lassen sich die entstandenen gashaltigen Mikropartikel der erforderlichen Dichte durch Flotation oder Zentrifugation, von eventuell ebenfalls vorhandenen soliden oder immer noch wassergefüllten Mikropartikeln abtrennen und falls erforderlich, möglichst unter Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriertrocknen. Die Mikropartikel enthalten dann den verkapselten Wirkstoff und Gas bzw. gasförmige Phase nebeneinander.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme aus den nach den vorbeschriebenen Verfahren hergestellten Partikel erfolgt durch Resuspendieren der Partikel in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium. Das Resuspendieren in

einem geeigneten Medium kann sich unmittelbar an den letzten Verfahrensschritt (die Gefriertrocknung) anschließen, kann aber gewünschtenfalls auch erst durch den behandelnden Arzt vor der Anwendung erfolgen.

In letzterem Fall liegen die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme als ein Kit, bestehend aus einem ersten die Partikel enthaltenden Behälter und einem zweiten das Suspensionsmedium enthaltenden Behälter, vor. Die Größe des ersten Behälters ist so zu wählen, daß auch das Suspensionsmedium in diesem vollständig Platz findet. So kann z. B. mittels einer Spritze über eine im Verschuß des ersten Behälters befindliche Membran, das Suspensionsmedium vollständig zu den Partikeln gegeben werden und durch anschließendes Schütteln die injektionsfertige Suspension hergestellt werden.

Als Suspensionsmedien kommen alle dem Fachmann bekannten injizierbaren Medien in Frage, wie z. B. physiologische Kochsalzlösung, Wasser p.i. oder 5%ige Glukoselösung.

Die applizierte Menge richtet sich nach dem jeweilig eingeschlossenen Wirkstoff. Als orientierender oberer Grenzwert kann ein Wert angenommen werden, wie er auch bei konventioneller Verabreichung des jeweiligen Wirkstoffs verwendet werden würde. Auf Grund des wirkungsverstärkenden Effekts sowie der Möglichkeit den Wirkstoff spezifisch aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären System freizusetzen, liegt die erforderliche Dosis im allgemeinen jedoch unter diesem oberen Grenzwert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

#### Beispiel 1

##### Coffein-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylat

Gasgefüllte Mikropartikel, die aus Butylcyanacrylsäure gemäß DE 38 03 972 hergestellt wurden, werden unter Zusatz von 2% (m/V) Polyvinylalkohol gefriergetrocknet. Es werden ca.  $3 \cdot 10^9$  Partikel in Form des Lyophilisats zusammen mit 50 mg Coffein in einen Autoklaven gefüllt. Das Gemisch wird bei ca. 45°C und 100–120 bar mit Kohlendioxid behandelt. Die Entfernung des überschüssigen Coffeins wird folgendermaßen durchgeführt: Die dem Autoklaven entnommenen Mikropartikel werden in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Partikel werden durch Zentrifugation abgetrennt und in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Zentrifugation mit anschließender Redispergierung in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, wird solange wiederholt, bis im Wasser kein Coffein mehr photometrisch bei 273 nm nachgewiesen werden kann.

#### Beispiel 2

##### Fibrinolytische Mikropartikel aus Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

2 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 10 mg r t-PA (Gewebsplasminogenaktivator) werden in 4 ml einer 4%igen wäßrigen Gelatine-lösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emul-

gierung werden 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78°C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf.

#### Beispiel 3

##### in vitro Freisetzung von Coffein durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 1 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von 10<sup>8</sup> Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer mittleren Schalleistung (Transmit ≤ 20 dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf Coffein bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit > 30 dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun nachweisbares freies Coffein, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte.

#### Beispiel 4

##### in vitro Freisetzung von r t-PA durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 2 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von 10<sup>8</sup> Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer geringen Schalleistung (Transmit ~ 10 dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf r t-PA bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit > 30 dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun nachweisbares freies r t-PA, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte. Die mit dem erhöhten Schalldruck behandelte Partikelsuspension weist fibrinolytische Eigenschaften auf.

#### Beispiel 5

##### Mitomycin-haltige Mikropartikel aus Polymilchsäure

2 g Polymilchsäure (MG ca. 20 000) werden in 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 20 mg Mitomycin werden in 15 ml 0,9%iger wäßriger Kochsalzlösung gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 1%igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG ca. 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden

durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5%igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (MG ca. 10 000) in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich auch als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Mitomycin frei.

#### Beispiel 6

##### Vincristinsulfat-haltige Mikropartikel aus Poly-ε-caprolacton

2 g Poly-ε-caprolacton (MG ca. 40 000) werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 10 mg Vincristinsulfat werden in 15 ml einer 5%igen wäßrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 5%igen Lösung von Humanalbumin in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5%igen Lösung von Humanalbumin in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Vincristinsulfat frei.

#### Beispiel 7

##### Ilomedin-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylsäurebutylester

3 g Polycyanacrylsäurebutylester werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 1 mg Ilomedin wird in 15 ml einer 5%igen wäßrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 2,5%igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 10%igen Lösung von Lactose in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Ilomedin frei.

#### Beispiel 8

##### Methylenblau-haltige Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

4 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 20 mg Methylenblau werden in 4 ml einer 4%igen wäßrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei  $-78^\circ\text{C}$  eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als  $0,7 \text{ g/cm}^3$  auf und setzen bei Beschallung mit Ultraschall (Schalldruck  $> 50 \text{ dB}$ , Frequenz  $2,5 \text{ MHz}$ ) Methylenblau frei.

#### Patentansprüche

1. Wirkstoffhaltige Mikropartikel, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel neben dem Wirkstoff auch eine gasförmige Phase enthalten.
2. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichte der Partikel kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$  ist.
3. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße  $0,1 - 8 \mu\text{m}$  ist.
4. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelhülle aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymeren aufgebaut ist.
5. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch abbaubares Polymer Proteine, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol, Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton oder deren Gemische verwendet wird.
6. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile bakteriologischer Zellwände, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, tromboolytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, Glykoproteine, Hormone, Zytokine und/oder Prostaglandine enthalten ist.
7. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß als gasförmige Phase Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Edelgase, Ammoniak und/oder Wasserdampf enthalten ist.
8. Mikropartikuläre Systeme bestehend aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln nach Anspruch 1—7.
9. Mikropartikuläre Systeme nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenen Partikel durch Einstrahlung von diagnostischem

Ultraschall unter Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs zerstört werden können.

10. Verfahren zur gezielten in vivo Wirkstofffreisetzung aus mikropartikulären Systemen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenen Partikel nach der Applikation mit diagnostischem Ultraschall bestrahlt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz des diagnostischen Ultraschalls  $1 - 6$  bevorzugt  $1,5 - 5 \text{ MHz}$  beträgt.

12. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß gashaltige Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas, bevorzugt in überkritischem Kohlendioxid, überkritischem Stickstoff, überkritischem Ammoniak sowie überkritischen Edelgasen, in einem Autoklaven behandelt, anschließend gewünschtenfalls gewaschen und gefriergetrocknet werden.

13. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von  $0,01 - 20\%$  ( $\text{m/V}$ ) gelöst wird und in diese Lösung eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert wird, daß eine Wasser in Öl Emulsion mit einer mittleren Teilchengröße der inneren Phase von ca.  $0,1$  bis  $10 \mu\text{m}$  entsteht, wobei beide Lösungen gegebenenfalls zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten können und man anschließend diese Emulsion unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gibt, das organische Lösungsmittel unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt, die so erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel falls gewünscht zunächst wäscht und anschließend, falls gewünscht unter Zugabe von gerüstbildenden Hilfsstoffen gefrier- bzw. sprühtrocknet und falls gewünscht in einem geeigneten Suspensionsmedium redispersiert und die Mikropartikel mit einer Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$  durch Flotation oder Zentrifugation abtrennt und falls erforderlich gewünschtenfalls unter erneutem Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriergetrocknet.

14. Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Systemen, dadurch gekennzeichnet, daß Mikropartikel nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium suspendiert werden.

15. Ein Kit bestehend aus einem ersten Behälter enthaltend die wirkstoff- und gashaltigen Mikropartikel nach Anspruch 1 und einem zweiten Behälter enthaltend eine pharmazeutisch verträgliche Trägerflüssigkeit, die nach Mischen mit dem Inhalt des ersten Behälters eine fließfähige injizierbare Suspension ergibt, wobei a) das Volumen des ersten Behälters so gewählt ist, daß zusätzlich zu den Partikeln auch die Trägerflüssigkeit vollständig Platz darin findet und b) beide Behälter jeweils eine Dosisinheitsmenge an wirkstoffhaltigen Mikropartikeln bzw. Trägerflüssigkeit enthalten.